＊＊

孵化鶏卵の胚体外膜構造物に関する研究

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター・専任研究員　池　郁生

＊＊

■　緒　言

我々は齧歯類の肺炎病原菌カー・バチルス（CAR（Cilia-associated respiratory）bacillus）の感染病理を研究している。本菌は、孵化鶏卵の漿尿膜腔で増殖することが知られている[1]。漿尿膜を始めとする孵化鶏卵の胚体外膜構造物はウイルスや細菌、蟯虫などの多くの病原体を増殖させることが知られ[2,3]、現在でもウイルス実験やウイルスワクチン製造などで盛んに利用されている。孵化鶏卵を用いた細菌の増殖モデルとしては、1960 ～ 1970 年代の、らい菌の感染系[4,5]や Tyzzer 菌の増殖[6]などに使われたが、最近ではほとんど用いられず、PubMed を検索しても 2000 年以後の文献を探し出すことは困難である。我々はカー・バチルスの検査抗原を作成するときに孵化鶏卵をよく使用する。孵化鶏卵が病原体、特に鶏卵の胚体外膜構造物が細菌増殖を支持する機構がほとんど研究されていないことに驚き、この機構を明らかにしたいと考えた。鶏卵をそのまま使うと卵殻の存在が内部の観察を阻害する。そこで我々は本研究で、孵卵 3 日目の有精卵の内容物をシャーレに移し、そのまま 10 日程度分化を進める方法を確立した。本法は非常にシンプルでありながら、卵内容物を Hamberger と Hamilton の胚発生ステージ[7]で HH20 前後から HH38 前後まで分化させることができ、胚体外膜構造物の形成過程の観察に最適である。我々はさらにこの方法を用いて、卵殻外培養卵内容物に形成された漿尿膜構造へカー・バチルスを投与し、同菌の増殖の有無を確かめた。

■　方　法

・有精卵の入手：有限会社大宮家禽研究所（埼玉県さいたま市）の Hy 系孵化 7 日鶏卵あるいは日生研株式会社小淵沢支社（山梨県北杜市）の Line-M 系白色レグホーンクローズドコロニー SPF ニワトリ種卵（孵卵 0 日）を用いた。

・孵卵：株式会社昭和フランキのベビー B 型孵卵器を使用した。取扱説明書に従い、卵を洗浄後、水を張った孵卵器に入れ、38℃で孵卵した。転卵回数は実測で、1 回 / 時だった（転卵クランク 1 回当たりの移動距離約 4.5cm、2 回で 1 往復）。

・卵殻外培養：E. I. Deryugina と J. P. Quigley の方法[8]を参考にした。検卵して胚の成長と気室部を確認後、卵殻外部を 70％エタノールで消毒して、ロータリツール（ドレメル、ボッシュ株式会社）を用いて、安全キャビネット内で鈍端 - 鋭端間最太部卵殻をぐるりと線を刻むように削り（図 1（A））、滅菌メス刃で内部構造を傷つけないよう卵殻膜に切れ目を入れ深型滅菌シャーレ（#906、Kord-Valmark）に卵内容物を回収した（図 1（B））。卵内容物は 37℃に設定したインキュベータ（MIR-262,Sanyo）で培養した（図 1（C））。

・孵化卵の胚体ならびに胚体外膜構造物の観察：孵化卵の気室部に 18G のディスポーザブル注射針で穴を開け、細刃のハサミで卵殻と卵殻膜を剥がし、卵白液を数 ml 除去した。肉眼および実体顕微鏡で胚体および胚体外膜構造物を観察した。胚体外膜構造物は 4％中性ホルマリン水溶液で固定し、独立行政法人放射線医学総合研究所（放医研）小久保年章博士によりヘマトキシリン＆エオジン染色標本を組織学的に検索した。

・カー・バチルス：カー・バチルスは、放医研でラットから分離された SMR 株[9]を Vero E6 培養上清を用いて純培養し、卵殻外培養胚体外膜構造物への感染源とした。カー・バチルスは位相差検鏡で形態判断し、16S rRNA 遺伝子配列を標的とした PCR 法[10]により確認した。

・孵化鶏卵によるカー・バチルスの鶏卵内培養：卵の気室部の卵殻を除去し、カー・バチルスの BALB/c マウス感染肺ホモジネートを漿尿膜部に注入後、開口部を封入した。気室側を上にしたまま孵卵を継続させ、所定の日数後に漿尿膜腔液を回収し、液中のカー・バチルスの存在を位相差検鏡で判定した。

・動物実験審査：孵化鶏卵での実験はニワトリに個体化する以前であれば動物実験とみなされない。マウスでのカー・バチルス感染実験は、理研バイオリソースセンターならびに放医研での動物実験委員会での承認を受けている。

■ 結 果

(1)孵化卵の胚体ならびに胚体外膜構造物の観察

孵化7日卵、孵化10日卵、孵化13日卵の漿尿膜を卵の気室側に開けた窓から観察した。いずれの日齢でも胚体と血管に富む漿尿膜を観察することができた。孵化7日卵では胚体は20mm程度に成長し、それに繋がる太い漿尿膜動静脈、そしてそれらから分岐する血管・毛細血管がはっきりと見えた。漿尿膜は、腔の下部にピンセットなどを入れることによって容易に卵黄嚢と分離することができ、実体顕微鏡下で毛細血管に富む様子が確認できた。組織学的には卵殻膜に接する数層の細胞から成るEctoderm、比較的太い血管が立体的に走るStroma、ならびに1層の細胞から成るEndodermから構成されていた。孵化10日卵では胚が30mm程度に成長し卵の鋭端側に潜りこんでいた。漿尿膜は卵黄嚢を覆うように広がりつつ漿尿膜動静脈が卵黄嚢を囲んで一周し、毛細血管叢が発達していた。孵化13日卵では胚が45mm程度まで成長して羽芽に覆われていた。漿尿膜の広がりはやや退行していたが、血管網は太く充実していた。

(2)孵化鶏卵内容物の卵殻外培養条件の確立

購入したHy系孵化7日卵をさらに3日孵卵し、孵化10日目に割卵して内容物を滅菌深型シャーレに回収後37 °Cで培養した。卵殻外培養3日目の観察で、胚は発育を継続し、心拍があり、漿尿膜動静脈の赤血球供給が続いていたことから漿尿膜の成長があると判断した(図1(D))。そこで孵化7日卵を再孵卵なしに割卵して内容物を卵殻外培養した。しかしこの場合、卵殻外培養7日目も11日目も胚と漿尿膜の成長は見られなかった。漿尿膜動静脈は白色の管として見られ、機能していないと判断した。次に、DeryuginaとQuigleyの報告[6]に倣い、孵化3日卵を卵割して卵内容物を卵殻外培養した(図2(A))。その結果、率は低いものの卵殻外培養6日目(図2(B))、7日目(図2(C))、11日目(図2(D))において胚と漿尿膜の成長が見られることが分かった。卵殻外培養11日目の胚はHamburgerとHamiltonの胚発生ステージ[7]でHH36に相当していた。カー・バチルスの孵化鶏卵培養では、孵化9日卵に菌を接種し、孵化14～16日に菌を回収する。そのタイムポイントにおいてシャーレ内で確認可能な胚および胚体外膜構造物の成長があることから、孵化3日卵の卵内容物を卵殻外培養するのが一番よいと考えた。

この時点でHy卵の入手ができなくなったので以後はLine-M卵を用いた。

(3)卵殻外培養条件の再検討

Line-M孵化3日卵を用いて孵化鶏卵内容物の卵殻外培養条件を再検討した。孵卵3日卵内容物の卵殻外培養を行い、所定の日数後の胚の成長を調べると、卵殻外培養10日までは卵内容物の40～50%が分化を継続していた(表1)。胚体は盛んに拍動を続け、漿尿膜の血管は鮮血で輝き、赤血球が勢いよく循環している(図2(B)(C)参照)。卵殻外培養11日に至ると、1例(図2(D))を除き、胚体は拍動を停止し、漿尿膜の血管は白濁化し、赤血球の循環は見られない(表1)。卵殻外培養10～11日まで生存したLine-Mの胚体はHy卵の胚体より大型で、羽芽の生え方や後肢の鱗から判断するとHH38前後に達するようだ(図2(D)、図3(D))。

なお、卵殻外培養は、通常の37°Cインキュベータがよいと判断した。5% CO_2/95% airの細胞培養用インキュベータでは、卵殻外培養数日で卵内容物は死亡した。

(4)卵殻外培養孵化鶏卵内容物へのカー・バチルス投与

Line-M孵化3日卵の内容物を卵殻外培養し、卵殻外培養7日目にカー・バチルスを漿尿膜部へ注入してさらに3日培養を続けた。卵殻外培養10日目(カー・バチルス投与3日目)に観察すると、2サンプルのうち1サンプルで胚体が生存しており(図3(A))、明白な拍動が認められ、漿尿膜血管での赤血球循環も確認できた(図3(C))。胚体は、頭尾長が70mmほどまで達していた(図3(B))。さらに生存胚体の漿尿膜腔液を採取して位相差検鏡したところ、カー・バチルスの存在が確認された。

卵殻外培養Line-M種卵内容物の漿尿膜腔液を高速遠心し、沈渣からDNAを抽出して、PCR法でまずカー・バチルス特異的な16S rRNA遺伝子領域をPCR法で増幅した。その結果、カー・バチルス特異的なバンドが、2種類のプライマセットの両方共に認められた。さらに、漿尿膜腔液をVero E6細胞培養上清で培養すると、カー・バチルスが増殖してくることが認められた。この結果は漿尿膜腔液に見られたカー・バチルスが生きていたことを意味する。

これらの結果より、卵殻外培養孵化鶏卵内容物に形成された漿尿膜などの胚体外膜構造物へカー・バチルスを注入すると、少なくともカー・バチルスが生存を続けることを意味すると考えたのだが、その後、本結果はリピートできていない。同じ条件でカー・バチルスを漿尿膜腔へ注入しても所定の培養後の漿尿膜腔液からカー・バチルスが回収できないのである。

(5)孵化鶏卵へのカー・バチルス接種

基本に立ち戻り、Line-M系卵を孵卵し、所定の日数後に鈍端部へ開けた穴からカー・バチルスを漿尿膜腔へ投与して、菌の増殖を確かめた。その結果、孵卵9日目に投与、孵卵16日目に採材という通常プロトコールでは、カー・バチルスが全く回収できなかった。そのため、カー・バチルスの接種時期を孵卵6～8日目まで動かし、また採材時期も変えてみたが本菌を漿尿膜腔から回収することはできなかった。

■ 考 察

平成23年度にHy系孵化鶏卵入手ルート(大宮家禽研究所)が使えなくなったことの影響は非常に大きい。結果の「(5)孵化鶏卵へのカー・バチルス接種」で示したように、従来、大宮家禽研究所のHy系孵化鶏卵で行なっていたカー・バチルスの孵化鶏卵増殖系が、日生研のLine-M種卵では動かないのである。早急に代替卵の入手ルートを再確立しなければならない。カー・バチルスはペニシリンやカナマイシンなど多くの抗生物質に感受性であることがわかっている。鶏卵中に飼料から抗菌性物質が混入していることをまず考えたが、少なくとも日生研の資料によると飼料に抗菌性物質は入っていないようである。予想しなかったのであるが、もしかするとカー・バチルスの増殖を支持するために何らかの鶏卵内因子が関与する可能性も考えられる。

平成24年度から国立大学法人名古屋大学生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センター(名大ABRC)がニワトリ・ウズラリソースの収集・保存・提供事業を開始した。このニワトリリソースを積極的に利用して、カー・バチルスの純培養系に孵化鶏卵の漿尿膜腔液を加えるなどして、まずはカー・バチルス感染に適当な種鶏卵の選別が必要であろう。現在、試験的に名大ABRCからWL-M/O系種卵の提供を受け、卵殻外培養を試している。他の系統の種卵にも対象を広げて最適な鶏卵種を選びたい。なお、名大ABRCでは種卵を採取する親鳥を日本農産工業株式会社のヘルシーS-セブンで飼養し、抗菌物質は餌に含まれていないとのことである。

卵殻外培養そのものについては、我々の手で既に30回近く行なっていて、技術的に確立したと考えている。今後は卵殻外培養10日目以後の生存卵の割合を上げることが可能か否か、技術の安定化を図って行きたい。

卵殻外培養を深型滅菌シャーレで行うと、肉眼での内部観察が簡単ではあるが、顕微鏡を用いての観察では検体の厚みが原因となり、高倍率の検鏡ができない。観察時に検体を無菌的に圧迫してサンプルの見かけの厚みを減らすか、長焦点距離作動性の対物レンズを使用するなどして、顕微観察技術の改良・改善も必要である。また、カー・バチルスにGFPなどの蛍光タンパク質を発現させることによって、蛍光観察するのもよいと考える。

カー・バチルスはいわゆる難培養性細菌であったが、我々はカー・バチルスSMR株をVero E6培養細胞と共培養するなどして、本菌の純培養系を確立し、それを用いて全ゲノム遺伝子配列決定を終わらせた(文科省科研費挑戦的萌芽研究23659225)。現在、本菌のゲノム情報から遺伝子のアノテーションを行い、それらを基にして発現遺伝子のDNAカスタムチップを作成中である。このチップを利用することにより、感染時に動くカー・バチルスの遺伝子を探索することができるだろう。ニワトリの発現遺伝子DNAチップが販売されているので孵化鶏卵で動く遺伝子についての探索も可能である。今後、卵殻外培養での感染実験系を用い、孵化鶏卵で細菌感染時に発現される遺伝子、そして蛋白質を同定したい。

孵化鶏卵の卵殻外培養はシンプルな上に、発育する胚体と胚体外膜構造物を常時観察可能であり、また動物実験とはみなされないことから動物実験代替法としても利用価値の高い実験系である。本法をさらに発展させ、胚体外膜構造物の研究を進めていきたい。

■ 要 約

孵卵3日卵内容物を7日以上卵殻外培養可能な系を確立した。本系では卵殻外培養11日まで胚および胚体外膜構造物の継続的な成長が見られる。胚体外膜構造物で増殖する齧歯類の肺炎病原菌カー・バチルスは、低い確率ではあるが、本系で形成された漿尿膜腔で生存した。今後、本系でのカー・バチルス増殖に関係する因子を探索する予定である。

■ 文 献

1. J. R. Ganaway, et al., 1985, "Isolation, Propagation, and Characterization of a Newly Recognized Pathogen, Cilia-Associated Respiratory Bacillus of Rats, an Etiological Agent of Chronic Respiratory

Disease" *Inf. Immun.* 47: 472-479.
2. Unit-02-Basics of Virology and Parasitology, 2.3.6 Cultivation of viruses, [Internet] http://train-srv.manipalu.com/wpress/?p=112889
3. B. Fried and L. T. Stableford, 1991, "Cultivation of Helminths in Chick Embryos", *Adv Parasitol.,* 30: 108-165.
4. T. M. Buchanan and E. C. Gotschlich, 1973, "Studies on gonococcus infection III. Correlation of gonococcal colony morphology with infectivity for the chick embryo", *J.Exp.Med.* 137: 196-200.
5. R. S. Foster and J. W. Vinson, 1977, "Chicken embryo as an animal model for Gonorrhea", *Inf.Immun.* 16: 568-574.
6. K. Fujiwara et al. 1963, "Tyzzer's disease in mice: Pathologic studies on experimentally infected animals", *Jpn J Exp Med.* 33: 183-202.
7. V. Hamburger and H. L. Hamilton, 1992, "A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo", *Dev. Dnynam.* 195: 231-272. (Reprinted form J. Morphol. 1951, 88: 49-92.)
8. E. I. Deryugina and J. P. Quigley, 2008, "Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Models to Quantify Angiogenesis Induced by Inflammatory and Tumor Cells or Purified Effector Molecules", *Meth.Enzymol.* 444: 21-41.
9. S. Matsushita, 1986, "Spontaneous respiratory disease associated with cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in a rat", *Jpn. J. Vet. Sci.* 48: 437-440.
10. C. L. Franklin, et al., 1999, "Detection of Cilia-Associated Respiratory (CAR) Bacillus in Nasal-Swab Specimens from Infected Rats by Use of Polymerase Chain Reaction", *Lab.Anim.Sci.* 49: 114-117.

表１．孵化３日鶏卵内容物の卵殻外培養成績

卵殻外培養日数	生存卵数/卵殻外培養数	
5 日	11/23	47.8%
6 日	2/10	20.0%
7 日	6/12	50.0%
9 日	6/12	50.0%
10 日	4/12	33.3%
11 日	1/13	7.7%

Line-M 卵を 38℃にて 3 日間孵卵し、卵内容物を深型滅菌シャーレに回収して 37℃インキュベータにて培養した。卵殻外培養が 10 日を超えると生存胚(心拍の有無で確認)は減り、卵殻外培養 12 日目にはほぼすべての分化が停止して死亡する。卵殻外培養 2 日目の生存卵数が少ないのは、初期の未熟手技のためと考えられる。

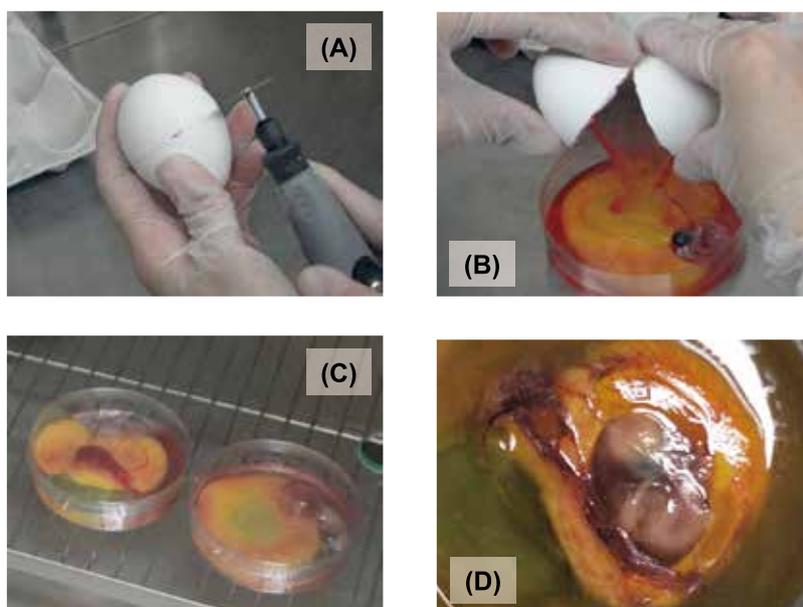
図１．孵化鶏卵内容物の卵殻外培養、具体的手技

Hy 系孵化 7 日卵を 38℃にてさらに 3 日(合計 10 日)孵卵し、検卵・消毒後、卵殻を線状に削った(A)。卵殻膜をメスの刃で切って深型滅菌シャーレに卵内容物を回収し(B)、37℃インキュベータにて培養した(C)。(D)は卵殻外培養 3 日目の卵内容物(孵卵 10 日、卵殻外培養 3 日、卵 10ヶのうちの 1ヶ)。胚の成長、心拍および漿尿膜動静脈の赤血球供給が認められる。

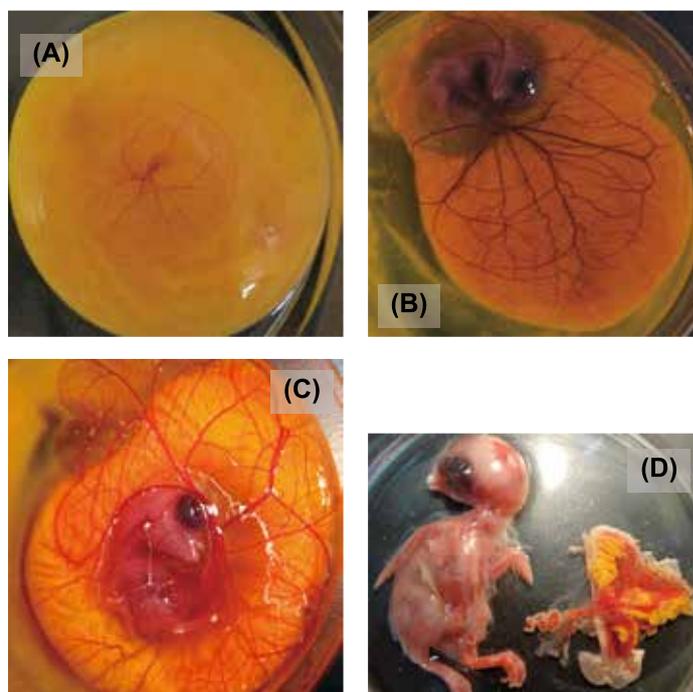
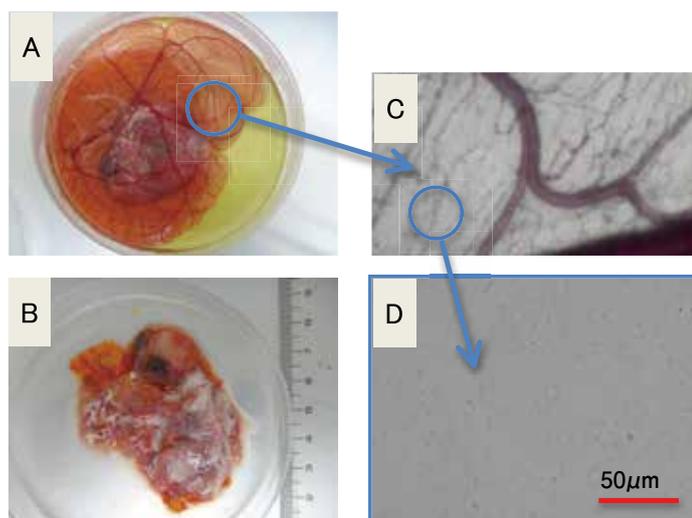
図２．孵化鶏卵内容物の卵殻外培養

Line-M 孵化 3 日卵の内容物を卵殻外培養した。(A)：孵化 3 日卵の卵内容物をシャーレに移したところ(卵殻外培養 0 日)。(B)：前孵卵 3 日、卵殻外培養 6 日の卵内容物(胚および胚体外膜構造物が成長している)。(C)：前孵卵 3 日、卵殻外培養 7 日の卵内容物(継続して胚および胚体外膜構造物が成長している)。(D)：前孵卵 3 日、卵殻外培養 11 日の胚と胚体外膜構造物(卵白と卵黄嚢のほとんどを除去している)(本法では、胚および胚体外膜構造物の成長はこの段階辺りで停止し、これ以上の成長は見られない)。

図３．卵殻外培養 Line-M 種卵漿尿膜腔に見られたカー・バチルス

Line-M 孵化３日卵の内容物を卵殻外培養した。卵殻外培養７日目にカー・バチルスを漿尿膜部へ注入し、さらに３日培養を続けた。(A)はカー・バチルス感染３日後の卵内容物(前孵卵３日、卵殻外培養 10 日)。頭尾長は 60mm ほどまで達し(B)、漿尿膜の血管は依然として血液を盛んに送り続けていた(C)。漿尿膜液を採取して位相差顕微鏡で観察すると、生きたカー・バチルスの存在を確認することができた(D)。